

Respiratory Syncytial Virus 재감염에 의한 기도과민성과 기도염증에 대한 Cytosine-phosphate-Guanine Oligodeoxynucleotides의 효과

¹국민건강보험공단 일산병원 소아청소년과, 연세대학교 의과대학 ²내과학교실, ³소아과학교실

장광천¹ · 이용원² · 김규언³ · 홍천수² · 박중원²

Effect of Cytosine-phosphate-Guanine Oligodeoxynucleotides on Airway Hyperresponsiveness and Inflammation of Repeated Respiratory Syncytial Virus Infection in a Mouse Model

Gwang Cheon Jang¹, Yong Won Lee², Kyu Earn Kim³, Chein Soo Hong² and Jung-Won Park²

¹Department of Pediatrics, NHIC Ilsan Hospital, Ilsan, Departments of ²Internal Medicine and ³Pediatrics, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Severe respiratory syncytial virus (RSV) infection in neonate has been reported as a risk factor for the development of allergic asthma or early transient wheezing. RSV can induce reinfection by the same strain. Reinfection after neonatal RSV infection can induce eosinophilic inflammation and aggravate airway hyperresponsiveness (AHR) in a BALB/C mouse model.

Objective: We evaluated whether cytosine-phosphate-guanine oligodeoxynucleotides (CpG ODNs) administration at initial RSV infection could prevent the aggravation of AHR and eosinophilic inflammation with repeated RSV infection in a mouse model.

Method: Mice were infected shortly after birth and were reinfected 5 weeks later by the intranasal administration of RSV (10⁶ pfu) and followed by the assessment of airway

function, airway inflammation, and lung histopathology. Phosphorothioate CpG (1,826s; 2 mcg/mouse) was also administered intranasally 2 days after initial RSV infection. **Result:** Repeated RSV infection induced methacholine (Mch) AHR, eosinophilic inflammation and goblet cell hyperplasia in the control ODN group. CpG ODN administration at initial RSV infection attenuated Mch AHR and eosinophilic inflammation, and decreased levels of IL-13 and IL-5, but increased IFN- γ in BAL fluid and RSV-IgG2a in sera.

Conclusion: These findings suggest that CpG ODN can be used to prevent of airway allergic inflammation by RSV reinfection. (Korean J Asthma Allergy Clin Immunol 2010;30:123-130)

Key words: RSV, Airway function, Animal model, CpG ODNs

서 론

Respiratory syncytial virus (RSV)는 세기관지염과 폐렴을 일으키는 원인이며 RSV에 의한 세기관지염은 영유아가 병원에 입원하게 되는 가장 흔한 원인 중 하나이다.¹⁾ 특히 영아기에 RSV감염에 의한 세기관지염을 앓게 되면 이후의 반복적인 천명성 질환과 소아기의 천식으로 이행할 위험이 매우 높은

것으로 알려져 있고, RSV 유행 시기에 급성 세기관지염은 아토피를 가진 경우에 더 잘 발생하며 RSV 세기관지염을 앓은 후 혈청 IgE가 증가한다는 보고가 있었다.^{2,3)} 다른 보고에 의하면 병원에 입원한 중증의 RSV 환자 47예를 7.5세까지 경과 관찰한 결과 천식 현증의 유병률이 23%인 반면에 대조군은 2%에 불과하였다.²⁾ RSV감염과 천식의 발병이 연관되어 있다는 연구들이 많았지만 아직 명확한 기전이 밝혀져 있지 않다. RSV감염이 알레르기 염증반응과 알레르겐에 대한 감각민도를 높여서 천식을 유발한다고 보고하고 있으나, 다른 연구자들은 유전적으로 아토피 배경이 있거나 기관지 과민반응이 있는 환아군이 RSV에 감염될 때 천식과 유사한 임상증상이 유발되고 천명음이 들리며 RSV감염이 천식을 악화시키는 요인이라고 보고하였다.^{4,5)}

RSV는 다른 호흡기 바이러스와 달리 인체에서 다양한 면역반응을 유발할 수 있으며, RSV 감염에 의해 획득된 면역력

본 연구는 학술진흥재단 선도연구자 지원과제(E00215) 지원으로 이루어졌음.

책임저자 : 박중원, 서울시 서대문구 신촌동 134

연세대학교 의과대학 내과학교실, 우: 120-752

Tel: 02) 2228-1961, Fax: 02) 2227-7932

E-mail: parkjw@yuhs.ac

투고일: 2009년 11월 30일, 심사일: 2010년 4월 18일

게재확정일: 2010년 5월 5일

에는 양면성이 있다. 한쪽에서는 감염에서 회복을 촉진하고 부분적인 예방 효과도 기대할 수 있지만 반대로 면역반응으로 인해 병변이 유도될 수 있다.⁶⁻⁸⁾ RSV에 감염된 일부 환자의 기관지 폐포 세척액에서 호산구가 증가하고, RSV 특이 IgE가 검출되며, 환자의 증상도 천식과 같은 천명음이 청진되어 Th2 면역반응이 관여한다는 보고가 있었다.⁹⁾ 마우스 동물실험에서도 감염 조건에 따라 Th1 면역반응 이외에도 Th2 알레르기 면역반응이 유발될 수 있다는 보고가 있었다. RSV는 paramyxoviridae family에 속하는 RNA 바이러스이며, 크게 A와 B strain으로 구분되고, 10개의 단백질로 구성되어 있으며 각 단백질이 일으키는 면역반응에 차이가 있다. 이 중 F protein은 Th1 면역반응을 유도하며, G protein은 Th2 사이토카인인 IL-5, IL-13 등을 생산하는 것으로 알려져 있다. 마우스 동물실험에서도 G protein이나 formaline inactivated RSV로 먼저 감염시킨 후 RSV에 감염시키면 호산구성 염증반응이 유발되며, Th2 사이토카인이 증가한다.¹⁰⁻¹²⁾ 지금까지의 연구 결과에 의하면 IL-4, IL-5와 특히 IL-13이 RSV에 의한 알레르기 염증반응, 기도 상피세포의 배상세포증식(goblet cell hyperplasia)을 유발시키는데 관여하는 것으로 알려져 있으며, IFN- γ 는 알레르기 염증반응을 억제한다는 보고가 있다.¹³⁻¹⁸⁾ 1960년대 말에 처음으로 formaline inactivated RSV백신이 개발되어 임상시험을 실시하였으나, 오히려 접종받은 소아중 RSV 감염에 의해서 80% 내외가 입원하였고, 일부 환자는 이로 인해 사망하였으며, 부작용을 보면 폐에 호산구 침윤이 현저하였다.¹⁹⁾ 이러한 현상으로 인해 RSV백신 개발에 어려움을 겪고 있다.

최근에는 기관지 천식의 치료에 DNA를 이용한 백신 및 치료에 대한 연구가 진행되고 있으며, 알레르겐을 코드화하는 plasmid DNA의 적용, DNA백신, Cytosine-phosphate-Guanine Oligodeoxynucleotide (CpG ODN) 등이 시도되고 있다.²⁰⁾

이에 저자들은 RSV 재감염 마우스 모델에서, 다른 동물 실험에서 높은 효율성과 특이성, 안정성이 증명된 CpG ODN을 이용하여 RSV 재감염에 의한 기도과민성과 염증반응을 예방하고 치료하는 방법을 개발하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 동물 및 RSV 감염

마우스는 생후 1주 이내 BALB/c를 사용하였고 specific pathogen free 상태에서 사육하였다. RSV는 human RSV A2 균주(catalogue no. VR 1302)를 사용하였다. RSV는 HEp-2 cell (Eagle's minimum essential medium (Gibco) supplemented with 2% fetal bovine serum)에 배양시켰으며, HEp-2 monolayer에 RSV를 inoculation시킨 뒤 주기적으로 관찰하여 80% 이상의 세포가

떨어져 뜰때 harvest하였다. 세포현탁액을 18°C에서 2,000 g로 15분간 원심분리하고, 바이러스가 포함된 pellet을 다시 신선한 배지(10 mmol/L PBS containing 15% sucrose)를 추가한 뒤 -70°C에 즉시 냉동 보관하였다. 바이러스 역가는 microplaque immunoperoxidase method에 따라 정량화 하였다.¹⁸⁾

각 군당 8마리씩 Sham군, control ODN군 및 CpG ODN군으로 나누었고, RSV는 생후 1주 이내(3~5일) BALB/c마우스에, 10 μ L의 RSV (1×10^6 pfu) 균주 용액을 마우스 비강을 통해 감염시켰다. RSV 초기 감염 후 2일 뒤에 Control ODN은 5'-TGACTGTGAAGGTTGGAGATGA-3' (GenoTech, Daejeon)과 CpG ODN은 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3' (GenoTech, Daejeon)을 비강 내로 2 μ g씩 투여하였다. 첫 감염 5주 후(생후 6주) 다시 동량의 RSV로 재감염 시킨 후 4일 뒤에 기도과민성을 측정하였고, 희생시킨 후 기관지 폐포세척술을 시행하고 병리 조직학적 연구를 위해 폐조직을 처리하였다(Fig. 1).¹⁸⁾

2. 기관지 과민반응 측정

RSV감염 후 기도과민성은 methacholine (Mch)을 3.1 mg/mL에서 50 mg/mL까지 nebulizer (Omron, Bannockburn, USA)로 단계적으로 두 배씩 증가하여 흡입시킨 후 기도저항의 변화를 forced oscillometer법(Flexivent system; SCRIPQUE, Quebec, Canada)으로 측정함으로써 판정하였다. 기도저항은 마우스를 pentobarbital (100 mg/kg)로 마취한 다음 기관절개술을 시행하고 18 gauge관을 통해 ventilator로 인공호흡(tidal breathing - 25.0 mL/kg, 호흡수 - 120회/min)을 시킨 상태에서 측정하였다.

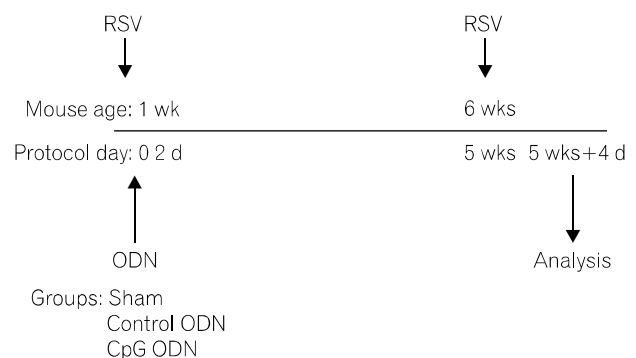


Fig. 1. Schematic of study protocol and exposure groups. Neonatal mice (within 1 weeks of age) were infected with RSV (1×10^6 pfu) and re-infected 5 weeks after primary infection (6 weeks of age) and followed by assessment of airway function, airway inflammation, and lung histopathology 4 days after RSV reinfection. CpG ODN (1,826 s; 2 mcg/mouse) or control ODN were also administered intranasally 2 days after initial RSV infection.

3. 기관지 폐포 세척액 및 병리소견

기관지 폐포 세척액(BAL fluid)은 Hank's Balanced Saline 용액 1 mL를 관류시켜 채취하였고, 채취한 세척액은 원심 분리하였다. 상층액은 사이토카인 농도측정에 이용하고 세포 침전물은 cytopsin으로 원심도말 한 다음 Diff-Quick (IMEB Inc., CA, USA)으로 염색하여 100배 시야에서 최소한 300개의 세포를 세어 폐포대식세포, 호산구, 림프구, 호중구를 감별 계산하였다. 폐조직은 10% formaline으로 고정 한 다음 paraffin block을 만들고, H&E 및 PAS 염색을 실시하였다.

4. 사이토카인 발현 및 RSV 특이 IgG2a 측정

BAL fluid 내의 IFN- γ , IL-13 및 IL-5의 변화량은 R&D systems (TECHNE Corporation, Minneapolis, USA)에서 구매한 시약으로 ELISA법에 의해 측정하였다. 마우스 혈청 내 RSV 특이 IgG2a (RSV-IgG2a)는 RSV를 2 μ L/mL로 피막한 후, ELISA plate에 시험혈청을 각각의 well에 100 μ L씩 4°C에서 24시간 반응시킨 뒤, horseradish peroxidase (HRP) conjugated monoclonal rat anti-mouse IgG2a (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) 100 μ L를 상온에서 1.5시간 반응시켰다. Substrate (p-nitrophenylphosphate, 1 mg/mL in diethanolamine buffer, pH 9.8)로 발색 반응을 하였고, microplate reader (Molecular Devices, CA, USA)로 흡광도 450 nm에서 측정하였다. 모든 시험 측정은 ELISA에서 두 개의 well에 중복 측정하였으며 통계처리를 위해 평균치를 산출하였다.

5. 통계

SPSS version 11.0 for Windows를 이용하여 자료에 대한 분석

을 시행하였다. 모든 변수는 평균 \pm 표준편차로 표시하였고, 95% 이상의 유의 수준을 인정하였다.

결 과

1. 기도과민성

기도과민성은 메타콜린농도가 25 mg/mL 일때 Sham군은 1.0425 \pm 0.1474 cmH₂O/mL/sec이었고, Control ODN군은 1.9100 \pm 0.1372 cmH₂O/mL/sec이었으며, CpG ODN군은 1.2080 \pm 0.1337 cmH₂O/mL/sec이었다. 메타콜린 농도가 50 mg/mL일 때 기도과민성은 Sham군이 1.1725 \pm 0.1089 cmH₂O/mL/sec이었고, Control ODN군이 3.6360 \pm 0.2475 cmH₂O/mL/sec이었으며, CpG ODN군이 1.7940 \pm 0.2541 cmH₂O/mL/sec이었다. Sham군에 비해서 Control ODN군에서 메타콜린에 대한 기도과민성이 통계적으로 의미있게 증가하였으며, CpG ODN군의 메타콜린에 대한 기도과민성이 Control ODN군에 비하여 낮게 측정되었다($P<0.01$, Fig. 2A).

폐순응도(compliance)는 메타콜린농도가 25 mg/mL일 때 Sham군은 0.0332 \pm 0.0043 mL/cmH₂O이었고, Control ODN군은 0.0166 \pm 0.0009 mL/cmH₂O이었으며, CpG ODN군은 0.02895 \pm 0.0025 mL/cmH₂O이었다. 메타콜린농도가 50 mg/mL일 때 폐순응도 Sham군이 0.0315 \pm 0.0025 mL/cmH₂O이었고, Control ODN군이 0.0095 \pm 0.0008 mL/cmH₂O이었으며, CpG ODN군이 0.0199 \pm 0.0041 mL/cmH₂O이었다. CpG ODN군이 Control ODN군에 비하여 폐순응도가 통계적으로 의미 있게 높게 측정되었다($P<0.05$, Fig. 2B).

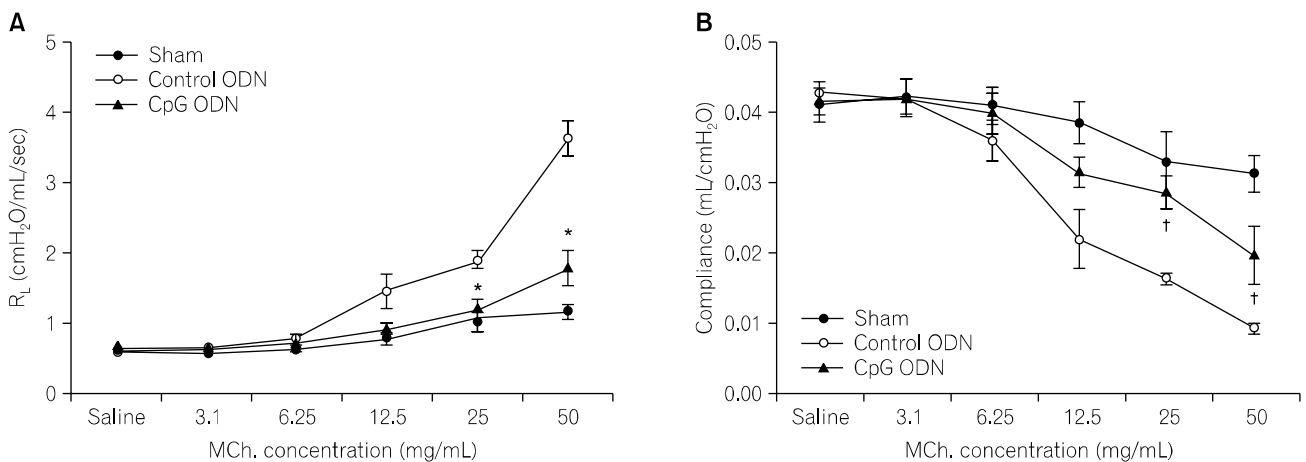


Fig. 2. Airway hyperresponsiveness develops after RSV re-infection and is not affected by administration of control ODN but affected by CpG ODN. There were differences between sham, control ODN, and CpG ODN group in airway resistance (A) and dynamic compliance (B) (* $P<0.01$; $^{\dagger}P<0.05$).

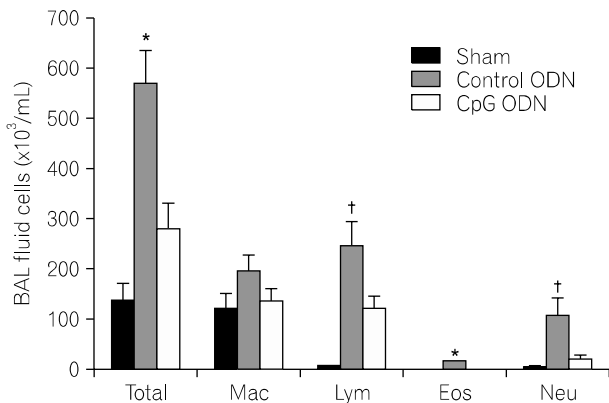


Fig. 3. Bronchoalveolar lavage (BAL) fluid cell counts. The results are from the same mice shown in Fig. 2. There were differences in BAL fluid lymphocyte (Lym), neutrophil (Neu) and eosinophil (Eos) counts between the control ODN and CpG ODN group (* $P<0.01$; † $P<0.05$).

2. 기관지 폐포 세척액내의 세포 소견

RSV 재감염된 군에서의 림프구, 호산구, 호중구가 증가하였으며, 기관지 폐포 세척액내 전체 세포수는 sham군 $140.0 \pm 32.9 \times 10^3$ cells/mL, CpG ODN군 $283.3 \pm 50.6 \times 10^3$ cells/mL에 비하여 Control ODN군이 $570.0 \pm 66.4 \times 10^3$ cells/mL로 통계적으로 유의하게 높았다($P<0.01$). 대식세포는 Control ODN군이 $199.2 \pm 28.4 \times 10^3$ cells/mL로 sham군 $123.0 \pm 29.8 \times 10^3$ cells/mL이나 CpG ODN군 $138.5 \pm 27.1 \times 10^3$ cells/mL에 비하여 높았으나 통계적으로 의미는 없었다. 림프구는 sham군 $7.5 \pm 1.8 \times 10^3$ cells/mL이나 CpG ODN군 $123.7 \pm 24.6 \times 10^3$ cells/mL에 비하여 Control ODN군이 $248.1 \pm 46.4 \times 10^3$ cells/mL로 통계적으로 유의하게 높았다($P<0.05$). 호산구는 sham군 $0.2 \pm 0.2 \times 10^3$ cells/mL이나 CpG ODN군 $0.5 \pm 0.3 \times 10^3$ cells/mL에 비하여 Control ODN군이 $16.4 \pm 3.7 \times 10^3$ cells/mL로 통계적으로 유의하게 높았으며($P<0.01$), 호중구도 sham군 $6.8 \pm 3.3 \times 10^3$ cells/mL이나 CpG ODN군 $23.0 \pm 7.5 \times 10^3$ cells/mL에 비하여 Control ODN군이 $109.8 \pm$

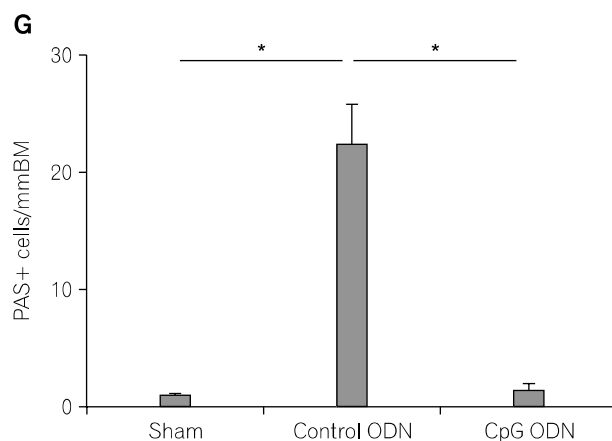
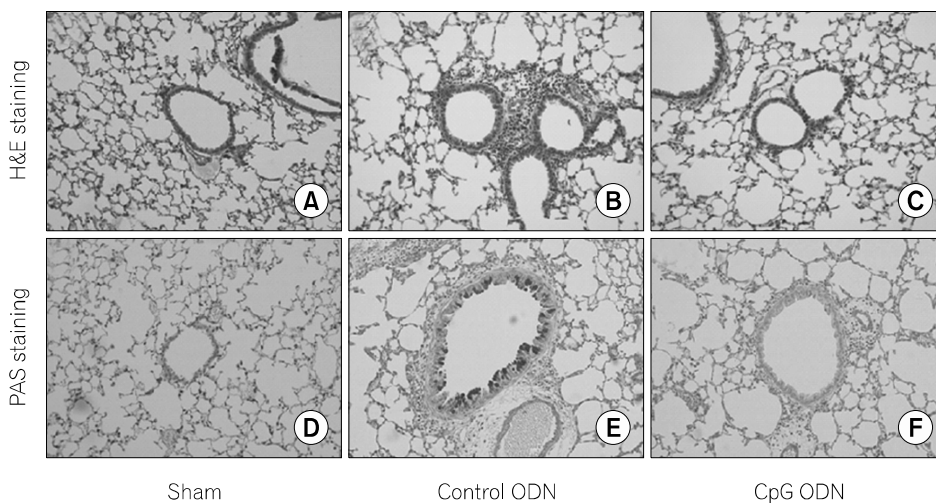


Fig. 4. Lung histologic features in respiratory syncytial virus (RSV)-reinfected mice (A~F) and quantitative analysis of periodic acid-Schiff (PAS)-positive cells in the central airways (G). Lung tissues were stained with H&E (A~C, $\times 400$) and PAS (D~F, $\times 400$). RSV reinfection causes peribronchial and perivascular inflammation and goblet cell hyperplasia in control ODN group (B, E, and G). In CpG ODN administration group, bronchial goblet cell hyperplasia was markedly decreased (C, F, and G). Results are expressed as the number of PAS-positive cells per millimeter of epithelial basement membrane (BM) (G) (* $P<0.01$).

36.4×10^3 cells/mL로 통계적으로 유의하게 높았다($P < 0.05$, Fig. 3).

3. PAS 양성 세포수의 비교 및 조직학적 소견

조직학적 소견을 보면 sham군과 Control ODN군을 비교해 보았을 때 RSV 감염이 기도염증과 기도 주변의 혈관을 따라 염증반응을 유발함을 관찰할 수 있었고, CpG ODN군에서는 Control ODN군에 비해 기도염증과 기도주변 혈관의 염증반응 및 배상세포 증식이 억제됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

기도 상피세포의 PAS 양성 세포수는 sham군 0.48 ± 0.92 cells/mmBM이나 CpG ODN군 1.45 ± 1.52 cells/mmBM에 비하여 Control ODN군이 21.75 ± 8.27 cells/mmBM로 통계적으로 유의하게 높았다($P < 0.01$, Fig. 4G).

4. 기관지 폐포 세척액내의 IL-13 비교

기관지 폐포 세척액내의 IL-13은 Control ODN군이 8.2 ± 2.4 pg/mL로 sham군 0.0 ± 0.0 pg/mL에 비하여 통계적으로 유의하게 높았고($P < 0.01$), CpG ODN군 1.8 ± 0.8 pg/mL에 비해서도 통계적으로 유의하게 높았다($P < 0.05$, Fig. 5A).

5. 기관지 폐포 세척액내의 IL-5 비교

기관지 폐포 세척액내의 IL-5는 Control ODN군이 $3,251.0 \pm 610.7$ pg/mL로 sham군 $2,344.0 \pm 652.7$ pg/mL이나 CpG ODN군 $2,432.0 \pm 326.4$ pg/mL에 비하여 통계적으로 유의하게 높았다($P < 0.05$, Fig. 5B).

6. 기관지 폐포 세척액내의 IFN- γ 비교

기관지 폐포 세척액내의 IFN- γ 는 Control ODN군이

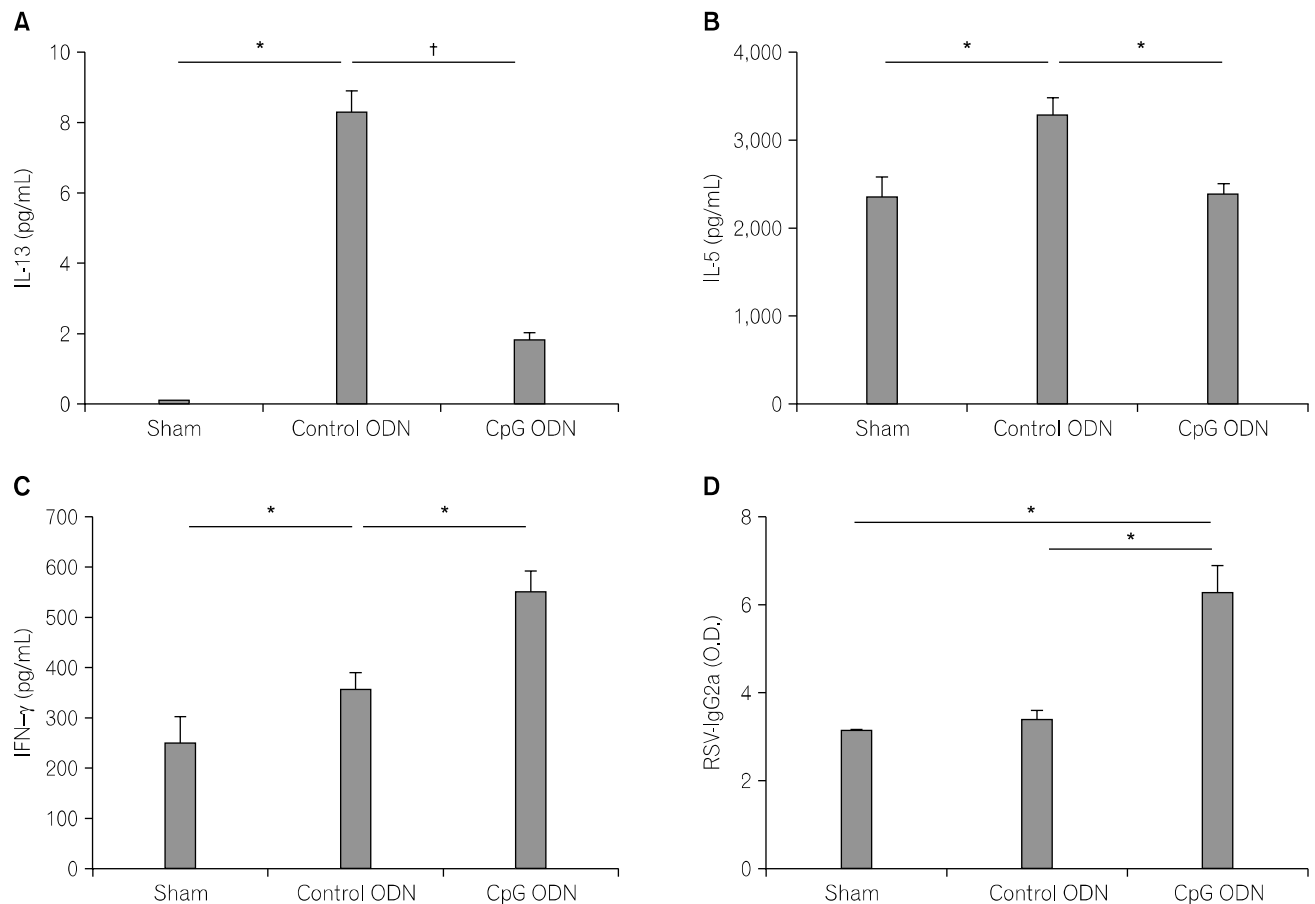


Fig. 5. Levels of cytokines in the bronchoalveolar lavage fluid (BAL) of RSV re-infected mice (A~C) and RSV-IgG2a in the sera of RSV re-infected mice (D). Level of IL-13 was lower in CpG ODN group than control ODN group (A). Level of IL-5 was increased in control ODN group, but the level of CpG ODN group was lower than control ODN group (B). Level of IFN- γ was more increased in CpG ODN group than in control ODN group (C). RSV-IgG2a of the sera was more increased in CpG ODN group than in other groups (D) (* $P < 0.01$; † $P < 0.05$).

355.0±149.4 pg/mL로 sham군 225.0±162.7 pg/mL에 비하여 통계적으로 유의하게 높았으며, CpG ODN군 550.0±168.8 pg/mL에 비해서는 통계적으로 유의하게 낮게 측정되었다($P < 0.05$, Fig. 5C).

7. 혈청에서의 RSV 특이 IgG2a 비교

혈청에서의 RSV 특이 IgG2a (RSV-IgG2a)는 CpG ODN군이 6.24±1.88 O.D.로 sham군 3.09±0.36 O.D.이나 Control ODN군 3.44±0.46 O.D.에 비하여 통계적으로 유의하게 높았다($P < 0.05$, Fig. 5D).

고 찰

RSV는 면역체계가 미성숙한 신생아나 영아에게 세기관지의 염증을 일으키고 이러한 염증반응은 다양한 기전으로 기도과민성을 유발하여 기관지 천명을 일으킬 수 있으며 기관지 폐포 세척액에서 호산구가 증가하거나 IL-4, IL-5와 IL-13이 증가하는 것이 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. RSV는 다른 호흡기 바이러스와 달리 감염에 의해 생기는 면역력이 불완전하여 1~2년 후에 동일한 strain의 RSV에 여러 번 재감염 되는 경우를 흔히 볼 수 있으며, 효과적인 백신이 개발되지 않고 있다.²⁰⁾ RSV에 감염된 후에도 오랫동안 기도에 남아 있어 만성적으로 기도 염증을 일으킬 가능성이 있다.²¹⁾ 마우스 감염 마우스 모델에서 RSV에 의해 유도되는 CD8+ 세포는 다른 호흡기 바이러스에 의해 유도되는 CD8+ 세포에 비해 IFN- γ , 항원자극에 의한 증식력 등 여러 기능이 떨어지는 것으로 보고된 바 있으며, 이러한 사실은 왜 RSV가 재감염이 잘되고 오랜 기간 기도에 잠복해 있을 수 있음을 부분적으로 설명하고 있다.²²⁻²⁵⁾

RSV 초기 감염 시 대표적인 Th1 사이토카인인 IFN- γ 가 현저히 증가하고 CD8+ T세포 침윤이 증가한다.²⁶⁾ 그러나 RSV가 알레르기 염증반응을 유발할 수 있음은 RSV 재감염 모델에서 알 수 있다. 생후 3주 이후에 처음 RSV에 감염된 경우에는 RSV 재감염시 기도과민성과 점액 생산이 억제되지만, 생후 1주내에 RSV에 감염되었다가 생후 6주에 재감염 되었을 때 Th2 면역반응이 유도되어 기도 점액 생산과 기도과민성이 증가하고 호산구 침윤이 증가한다고 하였다.¹⁸⁾ RSV 1차 감염과 재감염에 대한 다른 보고에서는 RSV 1차 감염 시에는 Th1 면역반응이 Th2 면역반응에 비해 우세하며 이로 인해 B세포에서 항바이러스 작용의 IgA와 IgG가 생성되어 RSV가 감소하여 치유단계로 넘어간다고 설명하고, RSV 재감염 시에는 Th2 면역반응이 Th1 면역반응에 비해 우세하여 IL-4, IL-5, IL-13과 histamine, prostaglandin이 증가하고 호산구가 증가하여 기도에서 호산구성 염증반응이 일어나서 급성

세기관지염 증세와 호흡기 천명이 일어난다고 설명하고 있다.²⁷⁾ 본 연구에서도 Control ODN군에서는 생후 1주 이내에 RSV에 감염되었다가 5주 후(생후 6주)에 재감염 되었을 때 Th2 면역반응이 유도되어 호산구성 염증반응과 더불어 강한 기도과민반응, 그리고 기관지상피세포에서의 배상세포 증식이 현저하게 증가됨을 관찰할 수 있었다.

DNA를 adjuvant로 한 연구는 1937년 Freund 등에 의해 처음 시작되었고,²⁸⁾ 최근에는 DNA 백신이 안전하면서도 세포성 면역반응을 유도하고 조절할 수 있다는 사실이 보고되면서 새로운 치료법으로 연구되고 있다.¹⁹⁾ 이러한 DNA 백신의 면역 활성은 백신벡터에 존재하는 DNA 염기서열인 CpG motif (5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine-3')에 의해 더욱 강화되는데 투여 후 수지상 세포와 같은 항원제시세포에서 MHC class II 분자와 CD80 및 CD86의 costimulatory molecule의 발현이 증가되고, 4시간 내에 IL-6, IL-12 등을 분비함으로써 Th2 사이토카인인 IL-4, IL-5, IL-13에 의한 염증 반응을 억제하고, NK 세포를 활성화시키며 T세포를 Th1면역반응 쪽으로 활성화시킨다. 또한 cytotoxic T 세포 생성과 Th1 사이토카인인 IFN- γ 의 분비가 증가되며 B 세포에서는 IgE의 생성이 감소하고 IgM과 IgG2a의 생산이 증가하여 광범위하게 염증반응과 면역 반응 조절에 영향을 준다고 하였다.²⁹⁾ 본 연구에서도 CpG ODN군의 IL-13과 IL-5가 Control ODN군에 비하여 낮게 측정되었으나, Th1 면역반응에 관여하는 IFN- γ 는 CpG ODN군이 Control ODN군에 비하여 높게 측정되었고 CpG ODN군의 RSV-IgG2a가 Control ODN군에 비하여 높게 측정되었다. Sham군의 기관지 폐포 세척액 내의 IL-13 농도가 낮아 폐조직을 균질화한 검체를 이용하여 측정해 보았으나 역시 낮았다. 또한 CpG ODN군의 호산구수와 기도과민성이 Control ODN군에 비하여 낮게 측정되었으며 이는 CpG ODN의 투여로 Th2 면역이 억제되고 Th1 면역반응이 유도되어 알레르기염증반응과 기도과민성에 영향을 주었을 것으로 추정된다.

천식 마우스 모델에서 CpG ODN의 투여는 IFN- γ 와 IL-12가 모두 없거나 두 가지 중 하나가 없는 경우에서도 기도의 호산구와 기관지 과민반응성을 감소시킬 수 있고, 이들 cytokine이 없는 상태에서는 CpG ODN의 농도가 더욱 많이 필요하다는 보고가 있었다.³⁰⁾ 본 연구에서는 결과를 보이지는 않았지만 CpG ODN의 농도를 0.5 μ g, 1 μ g, 2 μ g, 4 μ g, 10 μ g으로 투여하여 보았으나 차이를 보이지 않았고 다른 연구에서와 같이 고용량의 투여는 생후 1주 이내에 비강내로 많은 양을 투여해야 하는 어려움 때문에 시행하지 못하였다. 따라서 앞으로 IFN- γ knock out mouse를 통한 실험과 고용량 투여에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

CpG ODN의 투여경로와 시기에 따라 염증반응에 영향을

줄 수 있으며, 본 연구에서는 전신적인 투여에 의한 반응을 배제하기 위하여 비강내투여를 시행하였고, 생후 1주 이내에 많은 양의 RSV에 감염시키고 추가로 비강내로 ODN을 투여하는 모델이어서 실험체의 건강상태나 생존에 대한 영향을 고려하여 RSV 초기 감염 후 2일 뒤에 투여하는 방법을 사용하였다. 기관지 폐포 세척액내의 호산구수는 항원 유발전 복강내로 CpG ODN을 투여했을 때가 가장 많이 억제되었고 CpG ODN과 항원 유발을 동시에 했을 때는 비강내 투여나 복강내 투여가 비슷한 결과를 보인다는 보고가 있었다.³¹⁾ 전신적 투여에 비하여 국소적 투여의 경우 전신적인 독성 작용을 줄일 수 있지만 원하는 효과가 감소될 수 있는 단점이 있을 수 있다. CpG ODN 백신 접종은 다른 동물 실험에서 높은 효율성과 특이성, 안정성이 증명되고 있으며, 본 연구를 통해 RSV의 재감염에 의한 기도 염증반응과 기도과민성을 예방할 수 있는 방법으로 CpG ODN이 효과가 있음을 관찰할 수 있었다.

결론

마우스 모델에서 RSV 재감염은 기도과민성과 기도염증반응을 유도하며 배상세포 증식을 유도한다. CpG ODN의 초기 투여는 폐포 세척액내의 IFN- γ 와 혈청내의 RSV 특이 IgG2a가 증가하여, RSV 재감염에 의한 기도과민성의 증가, 기도염증반응, 폐포세척액내의 IL-13, IL-5 증가 및 기도 상피세포에서 배상세포 증식을 막는데 효과가 있었다. 이러한 사실은 RSV 감염 환아에서 천식으로의 이행이나 악화를 막기 위해 CpG ODN이 새로운 치료법으로 사용될 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

참고문헌

- Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med* 2001;344:1917-28
- Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:501-7
- Schauer U, Hoffjan S, Bittscheidt J, Kchling A, Hemmis S, Bongartz S, et al. RSV bronchiolitis and risk of wheeze and allergic sensitization in the first year of life. *Eur Respir J* 2002;20:1277-83
- Schwarze J, Hamelmann E, Bradley KL, Takeda K, Gelfand EW. Respiratory syncytial virus infection results in airway hyperresponsiveness and enhanced airway sensitization to allergen. *J Clin Invest* 1997;100:226-33
- Singh AM, Moore PE, Gern JE, Lemanske RF Jr, Hartert TV. Bronchiolitis to asthma: a review and call for studies of gene-virus interactions in asthma causation. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:108-19
- Schwarze J, Makela MJ, Cieslewicz G, Kakhama A, Lahn M, Ikemura T, et al. Transfer of the enhancing effect of respiratory syncytial virus infection on subsequent allergic airway sensitization by T lymphocytes. *J Immunol* 1999;163:5729-34
- Schwarze J, Cieslewicz G, Joetham A, Ikemura T, Hamelmann E, Gelfand EW. CD8 T cells are essential in the development of respiratory syncytial virus-induced lung eosinophilia and airway hyperresponsiveness. *J Immunol* 1999;162:4207-11
- Anderson LJ, Heilman CA. Protective and disease-enhancing immune responses to respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 1995;171:1-7
- Kim CK, Kim SW, Park CS, Kim BI, Kang H, Koh YY. Bronchoalveolar lavage cytokine profiles in acute asthma and acute bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:64-71
- Openshaw PJM, Clarke SL, Record FM. Pulmonary eosinophilic response to respiratory syncytial virus infection in mice sensitized to the major surface protein G. *Int Immunol* 1992;4:493-500
- Alwan WH, Kozłowska WJ, Openshaw PJ. Distinct types of lung disease caused by functional subsets of antiviral T cells. *J Exp Med* 1994;179:81-9
- Johnson TR, Parker RA, Johnson JE, Graham BS. IL-13 is sufficient for respiratory syncytial virus G glycoprotein-induced eosinophilia after respiratory syncytial virus challenge. *J Immunol* 2003;170:2037-45
- Park JW, Taube C, Yan ES, Joetham A, Balhorn A, Takeda K, et al. Respiratory syncytial virus-induced airway hyperresponsiveness is independent of IL-13 compared with that induced by allergen. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:1078-87
- Schwarze J, Cieslewicz G, Joetham A, Ikemura T, Makela MJ, Dakhama A, et al. Critical roles for interleukin-4 and interleukin-5 during respiratory syncytial virus infection in the development of airway hyperresponsiveness after airway sensitization. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:380-6
- Schwarze J, Cieslewicz G, Hamelmann E, Joetham A, Schultz LD, Lamers MC, et al. IL-5 and eosinophils are essential for the development of airway hyperresponsiveness following acute respiratory syncytial virus infection. *J Immunol* 1999;162:2997-3004
- Castilow EM, Olson MR, Meyerholz DK, Varga SM. Differential role of gamma interferon in inhibiting pulmonary eosinophilia and exacerbating systemic disease in fusion protein-immunized mice undergoing challenge infection with respiratory syncytial virus. *J Virol* 2008;82:2196-207
- Johnson TR, Mertz SE, Gitiban N, Hammond S, Legallo R, Durbin RK, et al. Role for innate IFNs in determining respiratory syncytial virus immunopathology. *J Immunol* 2005;174:7234-41
- Dakhama A, Park JW, Taube C, Joetham A, Balhorn A, Miyahara N, et al. The enhancement or prevention of airway hyperresponsiveness during reinfection with respiratory syncytial

- virus is critically dependent on the age at first infection and IL-13 production. *J Immunol* 2005;175:1876-83
- 19) Waris ME, Tsou C, Erdman DD, Zaki SR, Anderson LJ. Respiratory syncytial virus infection in BALB/c mice previously immunized with formalin-inactivated virus induces enhanced pulmonary inflammatory response with a predominant Th2-like cytokine pattern. *J Virol* 1996;70:2852-60
 - 20) Wohlleben G, Erb KJ. Atopic disorders: a vaccine around the corner? *Trends Immunol* 2001;22:618-26
 - 21) Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, Holberg CJ, Halonen M, Taussig LM, et al. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* 1999;354:541-5
 - 22) Henderson FW, Collier AM, Clyde WA Jr, Denny FW. Respiratory-syncytial-virus infections, reinfections and immunity. A prospective, longitudinal study in young children. *N Engl J Med* 1979;300:530-4
 - 23) Chang J, Braciale TJ. Respiratory syncytial virus infection suppresses lung CD8+T cell effector activity and peripheral CD8+T cell memory in the respiratory tract. *Nature Med* 2002;8:54-60
 - 24) Sheldock DJ, Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 2003;300:337-9
 - 25) Ku CC, Murakami M, Sakamoto A, Kappler J, Marrack P. Control of homeostasis for CD8+memory T cells by opposing cytokines. *Science* 2000;288:675-8
 - 26) Ostler T, Davidson W, Ehl S. Virus clearance and immunopathology by CD8+T cells during infection with respiratory syncytial virus are mediated by IFN-gamma. *Eur J Immunol* 2002;32:2117-23
 - 27) Becker Y. Respiratory syncytial virus (RSV)-induced allergy may be controlled by IL-4 and CX3C fractalkine antagonists and CpG ODN as adjuvant: hypothesis and implications for treatment. *Virus Genes* 2006;33:253-64
 - 28) Freund J, Casals J, Hosmer EP. Sensitization and antibody formation after injection of tubercule bacilli and paraffin oil. *Proc Soc Exp Biol Med* 1937;37:509-13
 - 29) Park Y, Lee SW, Sung YC. CpG DNA inhibits dendritic cell apoptosis by upregulating cellular inhibitor of apoptosis proteins through the phosphatidylinositol-3'-OH kinase pathway. *J Immunol* 2002;168:5-8
 - 30) Kline JN, Krieg AM, Waldschmidt TJ, Ballas ZK, Jain V, Businga TR. CpG oligodeoxynucleotides do not require TH1 cytokines to prevent eosinophilic airway inflammation in a murine model of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:1258-64
 - 31) Broide D, Raz E. DNA-Based immunization for asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;118:453-6